

I. Új vazoaktív szubsztanciák kardiovaszkuláris rendszer szabályozásában betöltött szerepének vizsgálata fiziológias és patofiziológias körülmények között.

(témavezető: Dr. Szokodi István)

A p38 mitogén-aktiválta protein kináz és az extracelluláris szignál-regulálta protein kináz szerepe a mechanikai feszítés indukálta GATA-4 aktivációban ex vivo

Háttér: A GATA-4 nevű transzkripciós faktor fontos szerepet játszik a szívhipertrófia irányításában. GATA-4 overexpressziója hipertrófiát képes indukálni mind *in vitro* kardiomiocita sejt kultúrában, mind *in vivo* transzgénikus állatok szívében. Korábbi eredményeink szerint mechanikai feszítés hatására rendkívül gyorsan fokozódik a GATA-4 DNS-hez való kötődése *ex vivo* izolált patkányszívben, azonban a GATA-4 aktivációjáért felelős szignál mechanizmusok nagyrészt ismeretlenek. Jelen munkákban a mitogén-aktiválta protein (MAP) kinázok családjába tartozó extracelluláris szignál-regulálta protein kináz (ERK), p38 MAP kináz és a C-Jun N-terminális protein kináz (JNK) szerepét vizsgáltuk.

Módszerek: Kísérleteinket hím, 7-8 hetes Sprague-Dawley patkányok szívében végeztük. Standard Langendorff technikának megfelelően retrográd perfundáltuk a szíveket módosított Krebs-Henseleit bikarbonát pufferrel. Kísérleteinkben az *in vivo* nyomástúlerhelés hatását kívántuk modellezni *ex vivo*, e célból a bal kamrába egy ballont helyeztünk melynek a volumenét addig növeltük, míg a bal kamrai szisztolés nyomás 130-150 Hgmm, a végdiasztolés nyomás 20-25 Hgmm közötti értéket el nem ért, majd a szíveket ily módon perfundáltuk 10 ill. 30 percig. A kontrollok esetében a szíveket üres ballon mellett perfundáltuk. A bal kamrai nukleáris extraktumokban a GATA-4 DNS-hez való kötődését elektroforetikus mobilitás shift assay (EMSA) segítségével vizsgáltuk. A MAP kinázok foszforilációját Western-blot, aktivitásukat specifikus enzim assay segítségével követtük.

Eredmények: A kamrai falfeszülés 30 perces növelése szignifikánsan fokozta a GATA-4 DNS-hez való kötődését. A GATA-4 aktivációját megelőzően, 10 perces stimuláció szignifikánsan növelte a p38, az ERK és a JNK foszforilációját. A p38 MAP kináz gátló SB239063 szignifikánsan csökkentette a falfeszülés kiváltotta p38 aktivációt valamint a GATA-4/DNS-kötődést. Hasonló módon, a MEK1/2 gátló U0126 szignifikánsan gyengítette a mechanikai feszítésre fellépő ERK foszforilációt és a GATA-4 aktivitást. Ezzel szemben a JNK gátlása (CEP11004) nem befolyásolta a GATA-4/DNS-kötődést.

Következtetések: Eredményeink szerint intakt szívben mind a p38 MAP kináz, mind az ERK fontos szerepet játszik a mechanikai túlterhelés során bekövetkező GATA-4 aktiváció szabályozásában.

Státusz: Eredményeinket közzétettük (Tenhunen és mtsai, J Biol Chem, 2004).

A B-típusú nátriuretikus peptid génexpressziójának szabályozása ex vivo patkányszíven

Háttér: A B-típusú nátriuretikus peptid (BNP) és a *c-fos* proto-onkogén fokozott expressziója a hipertrófiás folyamat markere. A BNP és a *c-fos* génexpressziójának szabályozásáról alapvetően *in vitro*, izolált neonatális kardiomiocita kultúrában nyert adatokkal rendelkezünk, a reguláció mikéntje intakt, felnőtt emlős szíven nagyrészt ismeretlen.

Célkitűzés: Célunk a transzkripció és poszttranszkripció mechanizmusok vizsgálata volt a BNP és *c-fos* gének expressziójának a szabályozásban felnőtt patkányszíven.

Módszerek: Kísérleteinket hím, 7-8 hetes Sprague-Dawley patkányok szíven végeztük a standard Langendorff technikának megfelelően. Az izovolémiásan kontraháló szíveken 50 percnyi ekvilibráció után a kamrába helyezett ballon volumenének növelésével 2 órás időtartamig fokoztuk a bal kamrai falfeszülést. A drogokat intrakoronáriásan infundáltuk a kamrai falfeszítés teljes időtartamára. Bal kamrai össz-RNS-t a guanidium izotiocianát-CsCl módszerrel izoláltuk, majd a BNP és *c-fos* gének mRNS-szintjét Northern-blot analízissel vizsgáltuk.

Eredmények: Northern-blot analízis szerint a kamrai falfeszülés 120 perces fokozása szignifikánsan növelte a BNP és a *c-fos* génexpresszióját. A transzkripciót gátló aktinomicin D csökkentette a bazális BNP mRNS szintet, azonban a feszülés által indukált BNP mRNS szint növekedést nem befolyásolta. A BNP-vel szemben a *c-fos* mRNS szint növekedését kivédte az aktinomicin D. A fehérje szintézist gátló cikloheximid növelte a bazális BNP mRNS szintet és kivédte a feszülés által indukált változást. A *c-fos* mRNS szint jelentékenyen emelkedett cikloheximid jelenlétében, azonban a feszítésre adott válasz változatlan maradt. A továbbiakban a gének expresszióját reguláló intracelluláris mechanizmusokat vizsgáltuk. A PKC gátló GF-109203X, a kalcineurin inhibitor ciklosporin A és FK-506, valamint a protein foszfatáz 2A (PP2A) gátló okadaik sav nem befolyásolta szignifikánsan a falfeszülés-indukálta BNP és *c-fos* mRNS-szint emelkedését.

Következtetések: Eredményeink szerint a mechanikai túlterhelés során bekövetkező BNP mRNS-szint növekedés független a transzkripciótól, azt poszttranszkripció mechanizmusok regulálják. Ezzel szemben a proto-onkogén *c-fos* mRNS-szintjének szabályozásában transzkripció mechanizmusok játszanak döntő szerepet. Továbbá, a BNP és *c-fos* gének regulációját a PKC, kalcineurin és a PP2A enzimek nem befolyásolják.

Státusz: Eredményeinket közzétettük (Tenhunen és mtsai, Regul Pept, 2005).

A B-típusú nátriuretikus peptid génexpressziójának szabályozása ex vivo egérszíven

Háttér: A koronáriaáramlás növekedésekor fokozódik a szívizom kontraktilitása és oxigénfogyasztása, melyet Gregg-effektusnak neveznek. A megnövekedett shear stressz fokozza az endothelin-1 (ET-1) és az

angiotenzin II (Ang II) endotheliumból történő felszabadulását, mely peptidek erőteljes stimulátorai a szívizomsejt-hipertrófiának. Azonban nem ismert, hogy intakt egérszíven a növekedési folyamatok és a Gregg-hatás között létezik-e interakció.

Célkitűzés: Választ kerestünk arra, hogy a Gregg-effektus képes-e fokozni a B-típusú nátriuretikus peptid (BNP) és *c-fos* proto-onkogén expresszióját, valamint az ET-1 és az Ang II szerepet játszik-e ebben a folyamatban intakt, felnőtt egérszíven.

Módszerek: Kísérleteinket hím, 10-13 hetes NMRI egereken végeztük. A szíveket a standard Langendorff technikának megfelelően retrográd perfundáltuk módosított Krebs-Henseleit bikarbonát pufferrel. Kezdetben a szíveket 2 mL/perc állandó áramlás mellett perfundáltuk majd 50 percnyi ekvilibráció után a koronáriaáramlást 5 mL/percre emeltük 2 órás időtartamra. A drogokat intrakoronáriásan infundáltuk a teljes kísérleti periódus alatt. Bal kamrai össz-RNS-t a guanidium izotiocianát-CsCl módszerrel izoláltuk, majd a BNP és *c-fos* gének mRNS-szintjét Northern-blot analízissel vizsgáltuk.

Eredmények: *Ex vivo* izolált, perfundált egérszíveken a koronáriaáramlás 2-ről 5 mL/percre történő emelése 2 órára szignifikánsan fokozta a BNP és a *c-fos* gének expresszióját. Az ET_{A/B}-receptor antagonistá bosentan 58%-kal, az ET_A-receptor antagonistá BQ-123 53%-kal, és az angiotenzin II 1-es típusú receptor antagonistá CV-11974 50%-kal csökkentette a Gregg-hatás által kiváltott BNP génexpresszió fokozódást. Ezzel szemben az inhibitorok nem befolyásolták a *c-fos* génexpresszióját.

Következtetések: Eredményeink szerint a koronáriaáramlás akut emelésekor jelentékenyen nő a hipertrófia marker BNP és *c-fos* gének expressziója egérszíven. Kimutattuk, hogy az endogén ET-1 és Ang II kulcsszerepet játszik a BNP-mRNS szabályozásában, míg a *c-fos*-mRNS regulációja független ezektől a parakrin faktoroktól.

Státusz: Eredményeinket közöltük (Piuholá és mtsai, Biochim Biophys Acta, 2007).

Az endogén ouabain-szerű anyag szerepe szívhipertrófiában

Háttér: *In vitro*, kardiomiocita sejt kultúrában nyert adatok szerint a Na⁺/K⁺-ATPáz gátló ouabain képes hipertrófiás választ kiváltani, azonban nem ismert, hogy a mellékvese eredetű endogén ouabain-szerű anyag (OLC) szerepet játszik-e a hipertrófiás folyamatot közvetítésében *in vivo* körülmények között.

Célkitűzés: Választ kerestünk arra, hogy az OLC termelődése hogyan változik kamrai hipertrófia kialakulása során ill. az OLC termelődés csökkentése miként befolyásolja a hipertrófiás folyamatot.

Módszerek: Vizsgálatainkat 8 hetes hím Sprague-Dawley patkányokon végeztük. Kísérleteinkben szubkután beültetett ozmotikus minipumpák segítségével noradrenalin (300 mikrog/kg/óra), angiotenzin II-t (Ang II) (33 mikrog/kg/óra) ill. a vivőanyagukat adminisztráltuk 12 és 72 óráig. A kísérleteket bilaterális

adrenalektómia mellett is elvégeztük. Izolált neonatális patkány kardiomiocita sejt kultúrában vizsgáltuk az exogén ouabain és az alfa-adrenerg agonista fenilefrin lehetséges kölcsönhatását, a sejteket 24 óráig kezeltük az egyes agonistákkal ill. kombinációjukkal. Az OLC plazmaszintet extrakciót követően specifikus radioimmunoassay segítségével határoztuk meg. Bal kamrai össz-RNS-t a guanidium izotiocianát-CsCl módszerrel izoláltuk, a sejt kultúrák mintáiból az RNS extrakció Trizol reagenssel történt. Az atriális nátriuretikus peptid (ANP) mRNS-szintjét Northern-blot analízissel vizsgáltuk.

Eredmények: 72 órás noradrenalin infúzió mellett szignifikánsan nőtt a bal kamrai tömeg/testtömeg arány és az ANP gén expressziója. A hipertrófiás változásokat átmeneti OLC plazmaszint emelkedés követte 12 óránál, mely visszatért az alap értékekre 72 óránál. Bilaterális adrenalektómia jelentékenyen csökkentette mind a bazális, mind a noradrenalin-indukálta emelkedett plazma OLC szinteket. Míg az adrenalektómia nem befolyásolta a noradrenalin infúzió által kiváltott bal kamrai hipertrófiát, addig az ANP génexpressziójának fokozódását 44%-kal ill. 47%-kal csökkentette 12 és 72 óránál. Összhangban ezen észlelésekkel, adrenalektómia esetén változatlan maradt az Ang II-indukálta bal kamrai tömeg növekedése, míg az ANP génexpressziós változás jelentősen elmaradt az intakt mellékvesékkel rendelkező állatokban tapasztaltakhoz képest. Továbbá, neonatális kamrai miocitákon nyert eredményeink szerint a fenilefrin hatása az ANP génexpressziójára jelentékenyen fokozódott exogén ouabain jelenlétében.

Következtetések: Adataink alapján valószínűsíthető, hogy a mellékvese eredetű OLC szerepet játszik az ANP génexpressziójának szabályozásában a hipertrófiás folyamat során.

Státusz: Eredményeinket közöltük (Skoumal és mtsai, Life Sci, 2007).

A nukleáris faktor-kappaB transzkripció faktor szerepének vizsgálata az angiotenzin II által indukált szívhipertrófiában in vivo

Háttér: A nukleáris faktor (NF)-kappaB nevű transzkripció faktor számos gén expresszióját szabályozza, melyek kulcsszerepet játszanak a gyulladásos folyamatok, az immunválasz, az apoptózis és a sejtosztódás regulációjában. Nyugalmi állapotban az NF-kappaB egy gátló fehérjéhez, az IkappaB-hez kötötten található meg a citoplazmában. Celluláris stressz során az IkappaB foszforilálódik, majd degradálódik. Az így felszabaduló NF-kappaB a sejtmagba transzlokálódik, ahol specifikus cél gének - mint a tumor nekrosis faktor-alfa, interleukin (IL)-2, IL-6, IL-8, angiotenzinogén, indukálható nitrogén oxid szintáz, ciklooxygenáz-2, etc. - transzkripcióját irányítja. Számos patológiás állapot esetén - mint szeptikus sokk, iszkémia-reperfúzió, allograft kilökődés, etc. - felvetették az NF-kappaB aktivációjának kóroktani szerepét a szívben. *In vitro*, kardiomiocita sejt kultúrában nyert adatok szerint az NF-kappaB részt vehet a hipertrófiás folyamat közvetítésében is, azonban e hipotézist *in vivo* körülmények között még nem vizsgálták.

Célkitűzés: Választ kerestünk arra, hogy az NF-kappaB DNS-hez történő kötődése fokozódik-e *in vivo* nyomásterhelés során, valamint az NF-kappaB jelátvitel gátlása befolyásolja-e a hipertrófiás folyamatot.

Módszerek: Vizsgálatainkat 8 hetes hím Sprague-Dawley patkányokon végeztük. Akut kísérleteink során angiotenzin II-t (Ang II) (0.5, 1.5 és 2.5 mikrog/kg/perc) ill. a vivőanyagát infundáltuk intravénásan 30 és 120 percig. A kísérleti állatokat egy specifikus NF-kappaB gátlószerrel (pirrolidin ditiokarbamát, PDTC; 100 mg/kg, intraperitoneális adás) ill. kontrollként a vivőanyagával kezeltük elő. Szubakut és krónikus kísérleteinkben szubkután beültetett ozmotikus minipumpák segítségével Ang II-t (0.5 vagy 2.5 mikrog/kg/perc) ill. a vivőanyagát adminisztráltuk 12 óráig és 6 napig PDTC (100 mg/kg/nap) ill. a vivőanyaga napi intraperitoneális adása mellett. A bal kamra funkcióját transtorakális echocardiographiával vizsgáltuk (Acuson Ultrasound System, Sequoia 512; 15-MHz-es lineáris transzducer, 15L8). A bal kamrai nukleáris extraktumokban az NF-kappaB és az aktivátor protein-1 (AP-1) DNS-hez való kötődését elektroforetikus mobilitás shift assay (EMSA) segítségével vizsgáltuk. Bal kamrai össz-RNS-t a guanidium izotiocianát-CsCl módszerrel izoláltuk, majd az egyes gének mRNS-szintjét real-time kvantitatív RT-PCR-rel, TaqMan reakció segítségével határoztuk meg (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems). Van Gieson ill. TUNEL-festéssel vizsgáltuk a bal kamrai fibrózist és apoptózist.

Eredmények: EMSA vizsgálataink szerint az Ang II dózisfüggően, bifázikus módon fokozta az NF-kappaB DNS-hez történő kötődését a bal kamrában. PDTC szelektíven csökkentette az NF-kappaB/DNS-kötődést, mivel AP-1/DNS-kötődést nem befolyásolta. 6 napos Ang II kezelés (2.5 mikrog/kg/perc) során 42%-kal ($P<0.001$) nőtt a bal kamrai tömeg/testtömeg arány, melyet a PDTC kezelés szignifikánsan csökkentett (24%-os növekedés, $P<0.01$). Echocardiographias vizsgálat szerint az Ang II+PDTC csoportban a bal kamrai falvastagság csökkenés ellenére a kamrai funkció megtartott volt. A bal kamra tömegének csökkentésével szemben a PDTC kezelés számos hipertrófiával kapcsolatos gén expresszióját szignifikánsan fokozta (B-típusú nátriuretikus peptid, szkeletális alfa-aktin, béta-miozin nehézlánc és endotelin-1). Hisztokémiai vizsgálataink szerint a PDTC kezelés jelentékenyen csökkentette az Ang II fibrotikus és apoptotikus hatását. Ezzel szemben enyhébb fokú hipertrófia kialakulását, melyet alacsonyabb dózisu Ang II-vel hoztunk létre (0.5 mikrog/kg per min), nem követte szignifikáns NF-kappaB aktiváció, valamint PDTC kezelés nem befolyásolta a hipertrófiás indexeket.

Következtetések: Eredményeink szerint az NF-kappaB transzkripció faktor fontos szerepet játszik a bal kamrai remodelling szabályozásában annak előrehaladott fázisában, míg enyhe fokú szívhipertrófia kifejlődése független az NF-kappaB rendszer aktivációjától. Ezen adatok arra utalnak, hogy az NF-kappaB gátlás terápiás haszonnal járhat a súlyos fokú bal kamrai remodelling visszafordításában.

Státusz: Eredményeinket az American Heart Association 2004-es kongresszusán mutattuk be (Sármán és mtsai, Circulation, 2004). Kézirat revízió alatt áll a *J Hypertens*-nél (Sármán és mtsai, kézirat).

Az endothelin-1 pozitív inotrop hatását közvetítő jelátvivő mechanizmusok vizsgálata ex vivo

Háttér: Az extracelluláris szignál-regulálta protein kináz (ERK) és a p38 mitogén aktiválta protein kináz (p38 MAPK) fontos regulátora a sejtek növekedési folyamatainak, a sejtproliferációnak ill. az apoptózisnak a szívben. Azonban kevés adat áll rendelkezésre, hogy ezen jelátvivők szerepet játszanak-e a kamrai kontraktilitás szabályozásában.

Célkitűzés: Célul tűztük ki az ERK és a p38 MAPK szerepének tisztázását az endothelin-1 (ET-1) pozitív inotrop hatásának kialakításában intakt, felnőtt emlős szívben.

Módszerek: Kísérleteinket hím, 7-8 hetes Sprague-Dawley patkányokon végeztük. Dekapitálás után a szíveket a standard Langendorff technikának megfelelően retrográd perfundáltuk módosított Krebs-Henseleit bikarbonát pufferrel. A kontraktilis erőt (apikobazális elmozdulás) egy erőmérő transzducerrel mértük (Grass Instruments, FT03), melyet a szív apexéhez csatlakoztattunk 2 g előterhelés mellett. 40 percnyi ekvilibráció és 5 perces kontroll periódus után a drogokat intrakoronáriásan infundáltuk 10 percig. A bal kamrai mintákból történt fehérjeextrakció után az egyes kinázok foszforiláltsági szintjét ill. aktivitását Western-blot és specifikus kináz assay segítségével vizsgáltuk.

Eredmények: *Ex vivo*, izolált perfundált patkányszíveken az ET-1 (1 nmol/L) 10 perces intrakoronáriás infúziója jelentős mértékben fokozta a kamrai kontraktilitást (40%-os emelkedés, $n=5$, $P<0.001$). Western-blot analízis szerint az ET-1 jelentős mértékben növelte az ERK és a p38 MAPK foszforilációját a bal kamrában. Az UO126, az ERK-t aktiváló MEK1/2 specifikus gátlószere, kivédte az ET-1-indukálta ERK foszforilációt, valamint 57%-kal csökkentette a peptid inotrop hatását ($P<0.001$). Specifikus p38 kináz assay szerint a p38 MAPK gátló SB239063 csökkentette az ET-1 által indukált p38 kináz aktivitást, és 42%-kal növelte az ET-1 inotrop effektusát ($P<0.001$). Korábbi adatok szerint izolált szívmus sejteken az ET-1 inotrop hatásához hozzájárul a protein kináz C (PKC) aktivációja, valamint a PKC képes fokozni az ERK foszforilációját. Western-blot analízis szerint az ET-1 enyhe mértékben fokozta a PKC-epszilon transzlokációját a szolubilis sejtfrakcióból a membrán sejtfrakcióba, míg a PKC-alfa és a PKC-delta izoformák sejtbéli eloszlása nem változott. A PKC gátló GF-109203X nem befolyásolta szignifikánsan az ET-1 inotrop hatását ($P=NS$), valamint az ET-1 által indukált ERK foszforiláció sem változott ($P=NS$). Összhangban ezen észlelésekkel, a foszfolipáz C (PLC) gátló U-73122 nem befolyásolta az ET-1 inotrop hatását ($P=NS$). *In vitro* adatok szerint az ERK foszforilációjában szerepet játszik az epidermális növekedési faktor-receptor (EGF-receptor) transzaktivációja. Kísérleteinkben az EGF-receptor tirozin kináz gátló AG1478 szignifikánsan csökkentette az ET-1 hatását az ERK foszforilációra és a kontraktilitásra ($P<0.01$). Az ET-1 fokozta a p90 riboszómális S6 kináz (p90RSK) foszforiláltságát, mely hatást mind az UO126, mind az AG1478 kivédett. A p90RSK egyik fő célpontja szívmus sejteken a Na^+-H^+ exchanger, mely aktivációja az intracelluláris Na^+ akkumulációt okozva indirekt fokozhatja a sejtbe történő Ca^{2+} beáramlást és így

hozzájárulhat a kamrai kontraktilitás növekedéséhez. Összhangban ezen elképzeléssel, a szelektív $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger inhibitor zoniporide 57%-kal gyengítette az ET-1 pozitív inotrop hatását ($P<0.01$).

Következtetések: Eredményeink elsőként vetik fel, hogy a szívizom-kontraktilitás ET-1 által történő szabályozásában a mitogén aktiválta protein kinázok döntő szerepet játszanak. A mitogén aktiválta protein kinázok kettős hatással bírnak, míg az ERK az ET-1 hatását közvetíti, a p38 MAPK negatívan modulálja azt. Továbbá kimutattuk, hogy az EGF-receptor az ERK proximális szabályozójaként, míg a p90RSK/ $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger jelátvivő útvonal az ERK effektoraként funkcionál az ET-1 inotrop hatásának közvetítésében.

Státusz: Előzetes eredményeinket az American Heart Association 2004-es kongresszusán mutattuk be (Szokodi és mtsai, *Circulation*, 2004). A kézirat revízió alatt áll a *Circulation*-nél (Szokodi és mtsai, kézirat).

Az altémához kapcsolódó publikációk:

1. Tenhunen O, Sármán B, Kerkela R, Szokodi I, Papp L, Tóth M, Ruskoaho H. Mitogen-activated protein kinases p38 and ERK 1/2 mediate the wall stress-induced activation of GATA-4 binding in adult heart. *J Biol Chem*. 2004;279(23):24852-24860. Impakt faktor (2004): 6.355
2. Tenhunen O, Szokodi I, Ruskoaho H. Posttranscriptional activation of BNP gene expression in response to increased left ventricular wall stress: role of calcineurin and PKC. *Regul Pept*. 2005;128(3):187-196. Impakt faktor (2005): 2.272
3. Piuhola J, Szokodi I, Ruskoaho H. Endothelin-1 and angiotensin II contribute to BNP but not c-fos gene expression response to elevated load in isolated mice hearts. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(3):338-344. Impakt faktor (2005): 2.382
4. Skoumal R, Szokodi I, Aro J, Földes G, Gööz M, Seres L, Sármán B, Lakó-Futó Z, Papp L, Vuolteenaho O, Leppäluoto J, deChâtel R, Ruskoaho H, Tóth M. Involvement of endogenous ouabain-like compound in the cardiac hypertrophic process in vivo. *Life Sci*. (nyomtatásban). Impakt faktor (2005): 2.512
5. Sármán B, Skoumal R, Leskinen H, Ilves M, Soini Y, Pikkarainen S, Lakó-Futó Z, Papp L, Tóth M, Ruskoaho H, Szokodi I. Inhibition of nuclear factor-kappaB signaling attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy, remodeling, and apoptosis. *Circulation*. 2004;110(17 Suppl. III):III-21-III-21. (Absztrakt)
6. Sármán B, Skoumal R, Leskinen H, Rysä J, Ilves M, Soini Y, Tuukkanen J, Pikkarainen S, Lakó-Futó Z, Sármán B, Papp L, deChâtel R, Tóth M, Ruskoaho H, Szokodi I. Nuclear factor-kappaB signaling contributes to severe, but not moderate, angiotensin II-induced left ventricular remodeling. Kézirat revízió alatt a *J Hypertens*-nél.
7. Szokodi I, Kerkela R, Kubin AM, Sármán B, Skoumal R, Papp L, Tóth M, Ruskoaho H. Functionally opposing roles of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of cardiac contractility. *Circulation*. 2004;110(17 Suppl. III):III-108-III-108. (Absztrakt)

8. Szokodi I, Kerkelä R, Kubin AM, Skoumal R, Sármán B, Pikkarainen S, Horváth IG, deChâtel R, Papp L, Tóth M, Ruskoaho H. Functionally opposing roles of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of cardiac contractility. Kézirat revízió alatt a *Circulation*-nél.

II. Szív MRI a myocardium perfúzió - funkció és viabilitás megítélésére (állatkísérletben, valamint PCI és CABG betegekben)

(témavezető: Dr. Simor Tamás)

Viabilitás, coronária occlusio idő okozta bal kamra funkció változása

Célkitűzés: Coronária occlusio idő függő regionális és globális bal kamra funkció változás okozta szívelégtelenség model kialakítása.

MRI vizsgálatokat Siemens Avanto 1.5 T készüléken végezzük. A remodeling vizsgálatára a kontroll és a beavatkozás napján elvégzett felvételeken túl ismételt felvételek készülnek 4 nap, 1, 2, majd 3 hónap múlva. Két vizsgálat típus_ (1) Movie MRI (részletes rövid tengely felvételek a bal kamra EDV, ESV, EF és regionális bal kamra funkció meghatározására). (2) Életképesség vizsgálat Magnevist (0.2 mmol/kg) MR kontrasztanyaggal. A viabilitás vizsgálat segítségével az infarktusos szegmentumok egzakt transmuralitás mértéke kerül meghatározásra.

Eredmények: 90 perces occlusiók: Ezeknél az állatoknál (mindösszesen 31 vizsgálat) a teljes PTCA occludalt ágrendszer infarctusát regisztráltuk. Ezen szegmentumokban a bal kamra izomzatának szegmentális analízise során a kialakuló hypokinezist, akinézist, dyskinesist analizáltuk. Regisztráltuk az elvékonyodott, anteroseptális anterior és csúcsi aneurysmák kialakulását. Aneurysmák esetén a szívizom 100% transmuralitással nem életképes, hypokinesis esetén csak subendocardiális jellegű necrosist, akinesis kialakulásánál pedig 50% feletti transmuralitással regisztráltuk a szegmentális necrosisok kialakulását. Az aneurysma kialakulás következtében szívelégtelenség jött létre jelentős bal kamra végdiastolés és végsystolés volumen emelkedéssel. A 90 perces occlusio tehát súlyos fokú szívelégtelenséget indukált.

A szívelégtelenség model következő, enyhébb formája esetében 60 perces occlusiót végeztünk 4 kísérletben, ahol aneurysma és következményes súlyosfokú szívelégtelenség kialakulását már nem észleltük, a késői típusú kontraszt vizsgálat dominálón subendocardiális jellegű necrosist mutatott, maximálisan akinetikus szegmentumok jelenlétében.

30 perces occlusiót 2 esetben alkalmaztunk. Az MRI necrosist, vagy falmozgászavart nem mutatott, szívelégtelenség nem alakult ki.

45 perces occlusio esetén (3 kísérlet) kevert forma alakult ki, 1 esetben necrosis nem alakult ki, 2 esetben pedig minimális subendocardiális necrosis jött létre falmozgászavar és következményes szívelégtelenség kialakulása nélkül.

Az altémához kapcsolódó publikációk:

1. Roka A, **Simor T**, Vago H, Minorics C, Acsady G, Merkely B. Magnetic resonance imaging-based biventricular pacemaker upgrade. **Pacing Clin Electrophysiol.** 27(7):1011-3 (2004)
2. **Simor T**, Gaszner B, Oshinski JN, Waldrop SM, Pettigrew RI, Horvath IG, Hild G, Elgavish GA. Gd(ABE-DTTA)-enhanced cardiac MRI for the diagnosis of ischemic events in the heart. **J Magn Reson Imaging.** 21(5):536-45 (2005) IF.: 2,470
3. Vertesaljai M, Piroth Z, Fontos G, Toth A, **Simor T**, Lueff S, Remenyi P, Reti M, Masszi T, Andreka P. [Experiences with the first, Hungarian autologous bone marrow cell transplantation in acute myocardial infarction] **Orv Hetil.** Jan 8;147(1):3-6 (2006).
4. Suranyi P, Kiss P, Brott BC, **Simor T**, Elgavish A, Ruzsics B, Saab-Ismail NH, Elgavish GA. Percent infarct mapping: an R1-map-based CE-MRI method for determining myocardial viability distribution. **Magn Reson Med.**;56:535-45. (2006) IF.: 3,508
5. Ruzsics B, Suranyi P, Kiss P, Brott BC, Elgavish A, Saab-Ismail NH, **Simor T**, Elgavish GA. Gd(ABE-DTTA), a novel contrast agent, at the MRI-effective dose shows absence of deleterious physiological effects in dogs. **Pharmacology**;77:188-94. Epub 2006 Jul 27. (2006) IF.: 1,375
6. Kiss P, Suranyi P, **Simor T**, Saab-Ismail NH, Elgavish A, Hejjel L, Elgavish GA. In vivo R1-enhancement mapping of canine myocardium using ceMRI with Gd(ABE-DTTA) in an acute ischemia-reperfusion model. **J Magn Reson Imaging**;24:571-9. (2006) IF.: 2,470
7. P. SURANYI, P. Kiss, B. Ruzsics, B. C. Brott, **T. Simor**, G.A. Elgavish: Equilibrium Signal Intensity-Mapping, an MRI Method for Fast Mapping of Longitudinal Relaxation Rates and for Image Enhancement. Original research article. In Press. IF.: 2,470
8. P. SURANYI, P. Kiss, B. Ruzsics, B. C. Brott, **T. Simor**, A. Elgavish, R.A. Baker, N.H. Saab-Ismail, and G.A. Elgavish: In Vivo Myocardial Tissue Kinetics of Gd(ABE-DTTA), a Tissue-Persistent Contrast Agent. Original research article. In Press. **Magn Reson Med.** MRM-05-8607.R1 IF.: 3,508
9. P. SURANYI, P. Kiss, T. Simor, A. Elgavish and G.A. Elgavish: A Combined Method for the Determination of Myocardial Perfusion in Experimental Animals Using Microspheres and MRI. Original research article. In Press. **Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance**; JCMR-6010-R2 IF.: 1,438
10. Komócsi A, **Simor T**, Tóth L, Szabados S, Mágel F, Pintér T, Aradi D, Kónyi A, Horváth IG, Papp L.: Magnetic resonance studies in management of adult cases with Bland-White-Garland syndrome. **Int J Cardiol.** 2006 (in press) IF.: 1,765

III. Genetikai és szív MRI vizsgálatok hypertrophiás cardiomyopathiás betegekben

(témavezető: Dr. Simor Tamás)

A hypertrophiás cardiomyopathia (HCM) relative gyakori (1:500 a felnőtt populációban), genetikailag meghatározott primer szívizombetegség, ami a hirtelen szívhalál egyik leggyakoribb oka egészségesnek hitt fiatal felnőttekben. Klinikai megjelenése igen heterogén, így korai felismerése és a rizikó helyes felmérése

gyakran gondot jelent. A kontrasztanyag szívi MR vizsgálat – a guideline-okban szereplő, jól ismert paraméterek kiegészítéseként – kiváló módszer a magas rizikójú HCM-es betegek kiszűrésére. Ezzel kapcsolatos vizsgálataink eredményét a Magyar Kardiológusok Társasága 2006 évi ülésén, Balatonfüreden (Tóth és mtsai, *Cardiol Hung*, 2006), majd az EUROECHO kongresszuson, Prágában mutattuk be (Tóth és mtsai, *Eur J Echocardiogr*, 2006).

A szokásostól eltérő morfológiájú bal kamrák esetében, pl. hypertrophiás és dilatativ cardiomyopathiás (DCM) betegekben a bal kamrai izomtömeg meghatározására szolgáló echocardiographiás módszerek korlátozott értékűek. A szívi MR vizsgálat az izomtömeg pontosabb meghatározását teszi lehetővé. Ezzel kapcsolatos észrevételeinket „letter to editor” formájában az *American Heart Journal*-ban publikáltuk (Faludi, Tóth, *Am Heart J*, 2006). A szívi MR segítségével meghatározott izomtömeg az említett kórképekben szoros negatív korrelációt mutat a bal kamra longitudinális systoles funkcióját jellemző szöveti Doppler paraméterrel. Ezen eredményt poszter formájában az Európai Kardiológus Társaság által szervezett Heart Failure (Helsinki, 2006) kongresszuson ismertettük (Faludi és mtsai, *Eur J Heart Fail*, 2006).

A bal pitvari volumen a bal kamrai végdiasztolés nyomás és ezáltal a bal kamrai disztolés funkciózavar jellemző paramétere, mely a pillanatnyi volumenterheléstől független. Munkacsoportunk a bal pitvari volument leginkább meghatározó hagyományos és szöveti Doppler echocardiographiás paramétereket vizsgálta HCM-es ill. DCM-es betegekben. Tapasztalatainkat a Magyar Kardiológusok Társasága 2006 évi ülésén, Balatonfüreden ismertettük (Faludi és mtsai, *Cardiol Hung*, 2006).

A nonkompakt cardiomyopathia igen ritka kórkép, mely az utóbbi néhány évben került a figyelem középpontjába. A szokványos képalkotó eljárásokkal felismerése gondot jelenthet, így a HCM-es csoporthoz hasonlóan a kontrasztanyag szívi MR vizsgálat kiváló diagnosztikus lehetőség e betegcsoport vizsgálatára is. Nagyszámú nonkompakt cardiomyopathiás beteg részletes vizsgálata során nyert első tapasztalatainkat az SCMR Kongresszuson, Rómában ismertettük, 2007. februárjában (Tóth és mtsai, *J Cardiovasc Magn Reson*, 2007).

Az altémához kapcsolódó publikációk:

1. Tóth L, Faludi R, Földi E, Knausz M, Repa I, Papp L, Simor T. A szívi-MR vizsgálat jelentősége a hirtelen halál rizikójának felmérésében hipertrófiás kardiomiopátiás betegekben. *Cardiol Hung*. 2006;36(Suppl.):A88. (Absztrakt)

2. Tóth L, Faludi R, Földi E, Knausz M, Varga-Szemes A, Papp L, Simor T. Evidence based, MRI strengthened risk stratification strategy for hypertrophic cardiomyopathy patients - A follow up study. Eur J Echocardiogr. 2006;1(Suppl.):S205. (Absztrakt)
3. Faludi R, Toth L. Letter to the Editor. Am Heart J. 2006;152:e13. IF: 3.552
4. Faludi R, Tóth L, Földi E, Költő Gy, Gyömörei B, Simor T, L. Papp. Correlation between longitudinal systolic function of the left ventricle and the "non-velocity-type" parameters characterizing left ventricular diastolic function. Eur J Heart Fail. 2006;1(Suppl.): 61. (Absztrakt)
5. Faludi R, Tóth L, Földi E, Gyömörei B, Költő Gy, Simor T, Papp L. Mely tényezők határozzák meg a bal pitvari volument hipertrófiás és dilatatív cardiomyopathiás betegekben? Cardiol Hung., 2006;36(Suppl.):A82. (Absztrakt)
6. Toth L, Varga-Szemes A, Faludi R, Toth A, Papp L, Simor T. MRI study in isolated left ventricular noncompaction. J Cardiovasc Magn Reson. 2007;9: 406. (Absztrakt)

IV. Nitrogén-oxid monitorozás iszkémiás szívbetegekben. Az endothel funkció non-invazív monitorozása

(témavezető: Dr. Cziráki Attila)

Az extrakorporális keringés során kialakuló oxidatív stressz reaktív szabadgyököket szabadít fel, amelyek hatására a vaszkuláris endothel/epithel is sérülést szenved és ennek következtében az endothelből nitrogén monoxid (NO) szabadul fel, valamint a NO-t produkáló enzimrendszerek aktiválódnak. Ez a jelenség megnyilvánulhat a kilélegzett NO mennyiségének növekedésében és kellően érzékeny, (6-8 részecske/1 billió molekula), kemilumineszcencia elvén alapuló eszközzel az NO szaporulat folyamatosan nyomon követhető. Továbbfejlesztettük a klinikánkon már korábban a vascularis endothel és pulmonális epithel károsodás markereként jellemzett NO meghatározást. Eddig az egyszeri kilégzéses teszt módszerét alkalmaztuk az ergometriás laboratóriumban terheléses vizsgálat előtt és után. 2004. évben kidolgoztuk és rutinszerűen alkalmaztuk az intraoperatív körülmények közötti NO mérés módszerét. Feltételeztük, hogy a CABG műtét során az extrakorporális keringés kiváltotta oxidatív stressz az NO termelés fokozódásában is megnyilvánul, amelyet folyamatosan tudunk mérni és regisztrálni a CABG műtét perioperatív időszakában. Ezért CABG műtetre kerülő ischaemiás szívbetegekben végeztünk folyamatos NO monitorozást a műtét alatt, illetve a szívműtétet követő perioperatív időszakban. Az NO termelés szignifikans változását észleltük a mellkas nyitása és az extrakorporális keringés megindítása időpontjában (Cziráki és mtsai, Cardiol Hung, 2005). Igazoltuk, hogy a human mitochondriumok nem termelnek releváns NO mennyiséget iszkémiás

szívbetegben (Csordás és mtsai, Life Sci, 2007). Továbbá, megvizsgáltuk a flavonoid suplementáció hatását krónikus obstruktív tüdőbetegségben, NO kilégzés módszerével (Balaskó és mtsai, 2007).

Az NO mérésen túl, az endothel diszfunkció vizsgálatát az artériás stiffness paraméterek segítségével is meghatároztuk (Cziráki és mtsai, Eur Heart J, 2006; Miklán és mtsai, Eur J Echocardiogr, 2006). Klinikánkon elvégeztük az Arteriográf invazív, validációs vizsgálatát (Horváth és mtsai, 2007).

Az asszimmetrikus dimetil-arginin (ADMA) az endothel diszfunkció egy új markere. Megvizsgáltuk a szérumban ADMA változását katéteres revascularizációs eljárások (PCI) átesett betegeknél. Az ADMA szinteket összehasonlítottuk a klasszikus rizikófaktorok, valamint egyéb non-invazív vizsgálati eredmények változásait (Ajtay és mtsai, 2007).

Az altémához kapcsolódó publikációk:

1. Cziráki A., Sárszegi Z., Gaszner B., Illyés M., Papp L. A vaszkuláris endothel és a pulmonális epithél noninvazív vizsgálata iszkémiás szívbetegben. Cardiol Hung. 2005;35:A50. (Abszakt)
2. Cziráki A., Gaszner B., Sárszegi Z., Horváth I., Illyés M., Papp L. Endothelial function in patients with ischaemic heart disease. Eur Heart J. 2006;27:124. (Abszakt)
3. Miklán D., Keller J., Sárszegi Z., Gaszner B., Cziráki A., Papp L. Evaluation of mechanical arterial properties in patients with coronary vasoconstriction. Eur J Echocardiogr. 2006;7:S120. (Absztrakt)
4. Csordas A, Pankotai E, Snipes JA, Cselenyak A, Sárszegi Z, Cziraki A, Gaszner B, Papp L, Benko R, Kiss L, Kovács E, Kollai M, Szabo C, Busija DW, and Lacza Z: Human heart mitochondria do not produce physiologically relevant quantities of nitric oxide. Life Sci. 2007;80(7):633-637. IF: 2.51
5. Balaskó M, Soós Sz, Cziráki A, Sárszegi Zs, Papp L, Garai J, Szelényi Z: The benefit of dietary flavonoids in chronic obstructive pulmonary disease in menopause. Eur Resp J. (revízió alatt)
6. Horváth I, Cziráki A, Gaszner B, Sárszegi Zs, Papp L: Invasive validation of a new, oscillometric, portable device for measuring augmentation index, and aortic pulse wave velocity simultaneously: the Arteriograph. J Hypertens. (közlésre elküldve)
7. Ajtay Z, Cziráki A, Horváth I, Papp L, Sulyok E, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM: The response of asymmetric dimethylarginine levels to stent placement in patients with coronary heart disease. Hypertension. (közlésre elküldve)

V. A poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) enzim aktivációjának szerepe iszkémiás állatkísérletes modellben**(témavezető: Dr. Cziráki Attila)**

Az iszkémiás szervek vérellátásának helyreállása (reperfúzió) hatására szabadgyökök, oxidatív intermedierek termelődnek, amelyek a reperfundált szervek károsodását válthatják ki. Ez az igen fontos, oxidánsok által kiváltott sejtkárosodáshoz vezető folyamat, részben a sejtmagban elhelyezkedő poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP) nevű enzim aktivációjának révén játszódik le. A PARP enzim aktivációját a reaktív oxigén gyökök által kiváltott DNS károsodás (a DNS kettős spiráljának törése) hozza létre. Állatkísérletes modellben patkány bal koszorúér rendszer leszálló szarának (LAD) elzárásával indukáltunk szívelégtelenséget. A kialakuló bal kamrai funkciózavart és a károsodott érrelaxációt a potens PARP inhibitor INO-1001 jelentős mértékben javította. Összhangban ezen eredményekkel, doxorubicinnel létrehozott szívelégtelenségben ill. bakteriális endotoxinnal kiváltott akut bal kamrai diszfunkcióban is hatékonyan bizonyult a PARP inhibitor. Összegezve, eredményeink felvetik, hogy a PARP enzim gátlása terápiás haszonnal járhat akut és krónikus szívelégtelenség kezelésében.

Az altémához kapcsolódó publikáció:

1. Pacher P, Liaudet L, Mabley JG, Cziraki A, Hasko G, Szabo C. Beneficial effects of a novel ultrapotent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in murine models of heart failure. Int J Mol Med. 2006;17(2):369-75. IF: 3.19

VI. A szívritmus variabilitás változásainak szerepe az iszkémia - reperfúzió során bekövetkező szövetkárosodás mértékének becslésében szívműtött betegekben és állatkísérletes modellben**(témavezető: Dr. Hejmel László)****A HRV elemző rendszer kifejlesztése:**

A szerző első számítógéphez csatlakozó, μ A741-alapú EKG erősítőt 1998-ban készíttette el. A digitalizálást és tárolást egy Borland Pascal és Assembly nyelven írt szoftver végezte a SoundBlaster-16 hangkártya vezérlésével 500 Hz mintavételi frekvenciával. Egy könnyebben kezelhető rendszer gondolata már az első mérések alkalmával felvetődött, mely 2002-ben realizálódott: a kiváló minőségű, egysatosítás

EKG az INA114 instrumentációs erősítő integrált áramkörre (Burr-Brown Corporation, Tucson, AZ) épült, 0.5-300 Hz frekvencia átvitelével. Az új rendszerben a digitalizálást egy ADC-42 analóg-digitális konverter (Pico Technology Ltd., St. Neots, UK) végzi 1 kHz frekvenciával, 12 bit mélységben egy notebook számítógépen, mely hordozható rendszert biztosít. A teljesen Windows-alapú EKG-rekorder (ECGRec 1.0), interaktív RR-intervallum detektor (ECGRdet 2.0) és a HRV elemző (Varian 1.1) szoftvereket Delphi nyelven készítette a szerző. A rendszer 1 ms maximális intervallum-detektálási hibát mutatott az EKG szimulátorral végzett teszt során, mely összemérhető az 1 kHz-hez tartozó mintavételi hibával.

Az intelligens RR-intervallum detektor többféle digitális szűrést (moving average, 50 Hz sávzáras, derivatív és 15-40 Hz sáváteresztés), direkt csúcsetektálást, a megszürt pozitív vagy negatív csúcs vagy a középpontjuk felismerését, az első pozitív csúcsot követő nulla átmenet azonosítását végzi választás szerint. Amplitúdó és RR-intervallum 30, 25, 20 és 15%) limiteket állíthatunk be, vizuálisan ellenőrizhetjük a folyamatot és vághatjuk a tachogramot.

A HRV elemző szoftver megadja az átlag, minimum és maximum RR-intervallumot, a szórást (SDNN - SD of the normal-to-normal intervals), a relatív átlagot (coefficient of variation, $CV = SDNN / \text{átlag}$), az egymás utáni RR-intervallum különbségek négyzetes átlagának négyzetgyökét (RMSSD - root mean square of successive RR-interval differences), továbbá az 50 ms-nál nagyobb szomszédos RR-intervallum különbségek százalékos arányát (pNN50 - percentage of RR-interval differences greater than 50 ms) a time domain paraméterek közül. A program kiszámítja a Fourier transzformációval kapható standard paramétereket, a Lorentz-plot-ot és származtatott paramétereit, és az intervallum hisztogramot számszerű jellemzőivel.

EKG szignálgenerátor és elemző rendszer

A jelgenerátor (ECGSim 1.0) a DaqBoard2000 gyárilag kalibrált adatgyűjtő kártyára (IOTech Inc., Cleveland, OH) épült. A mesterséges EKG-t off-line állították elő egyetlen szív ciklus mintának egy adott tachogram szerinti ismétlésével. Mindkettő betölthető meglévő fájlból vagy generálható a megadott paraméterek szerint, az Association of the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) ajánlásait követve. Adott amplitúdójú Gauss-féle zaj (elektromiográfiás zaj), 50/60 Hz szinusz hullám (hálózati interferencia), 5 Hz frekvenciájú (mozgási műtermék) és 0.5 Hz-es (légzési műtermék) szinusz jelek vagy ezek tetszőleges kombinációjának hozzákeverése is lehetséges. Az előállított jelet merevlemezen tárolják, 1000x erősítéssel és a folyamatos nagysebességű átvitel érdekében DMA (direct memory access) alkalmazásával játsszák vissza 10 kHz digitális-analóg átalakítással, 16 bit felbontással. A jelet a vizsgált szűrő előtt és után csatornánként 1 kHz frekvenciával, 16 bit mélységben digitalizálják és tárolják. E két utóbbi sorozatot közös fájlban tárolják.

Az elemző szoftver (ECGAn 1.0) a két csatornát tartalmazó fájlt nyitja meg, melyekben automatikusan detektálja a csúcsoakat (helyi maximumok) és a hozzájuk tartozó 2/3, 1/2 és 1/3 amplitúdó magasságokat

jelöli ki a felszálló és leszálló szárazon. A hét referencia pont közötti távolságot (RR-intervallum) vagy az eredeti sorozathoz hasonlított pozíciójukat határozza meg, mely vizuálisan ellenőrizhető.

Analóg felüláteresztő, aluláteresztő és sávzáró szűrőket készítettek az UAF42 (Burr-Brown Corporation, Tucson, AZ) monolitikus univerzális aktív filter integrált áramkör felhasználásával, melyet a gyártó által biztosított Filter42 szoftverrel méretezett külső alkatrészekkel hangoltak. Az áramköröket forrasztás nélküli próbapanelen (Type 4, Conrad Electronic, Germany) építették meg. Az 15 V kimenete \pm árnyékolást földelt fémdoboz, a tápellátást pedig a DaqBoard2000 biztosította. A 2. ábra mutatja a sávzáró szűrő és a 60 Hz-es aluláteresztő szűrők mért frekvencia átvitelét. A mintavételi hiba (sampling error, SE) a véges időközönként (mintavételi intervallum, sampling interval, SI) történő diszkretizálás következménye. A $0.5 \cdot SI \leq SE \leq$ szerző által fejlesztett szoftver (Samplerr 1.0) egy $-0.5 \cdot SI$ tartományba eső, egyenletes eloszlású véletlen sorozatnak a tachogramhoz való adásával szimulálta a mintavételi hibát. A kiindulási tachogram betölthető meglévő fájlból vagy generálható a program által (Gauss vagy egyenletes eloszlású random, megadott frekvenciájú szinuszoid, logisztikus, vagy a felsoroltak kombinálása egy adott frekvenciájú, fázisú és relatív amplitúdójú szinuszoid jellel). Az eredeti tachogramot egy választott (800 ms) átlaghoz tolták el, zsugorították vagy nyújtották egy tartományban megadott SD értékekre (pl. 5-30 ms, 5 ms lépésekben), és ☐ mintavételezték ☐ adott mintavételi periódusokkal (pl. 1-10 ms, 1 ms lépésekben). A mintavételezést tetszőleges, pl. 15 alkalommal lehet ismételni. Így összesen $6 \cdot 10 \cdot 15 = 900$ mintavételezett-beállított tachogramot generáltak a példában. Az ismételten mintavételezett tachogram csoportokban ($n=15$) az átlag RR-intervallum, SDNN, RMSSD és pNN50 átlagát, szórását, relatív torzítását (relative accuracy error, $RAE = (X_{\text{átlag}} - X_{\text{valós}}) / X_{\text{valós}}$) és relatív precizitását (relative precision error, $RPE = SD / X_{\text{átlag}}$) számították ki és hasonlították az eredeti, névlegesen nem szennyezett tachogramok paramétereire. A program eredménye szövegdobozban ellenőrizhető és .dat formátumban menthető további feldolgozás céljából.

Az alul- és felüláteresztő szűrők hatásának vizsgálata

Az EKG szimulátorral (3. 2.) állították elő az erősített EKG jelet, mely 21 ciklusból (20 RR-intervallum) állt a következő paraméterekkel: R_s -amplitúdó=4 V, T -amplitúdó=1.2 V, $R_T=350$ ms, $R_s=65, 85$ vagy 115 ms (ventricular complex duration, VCD), $T=180$ ms. A T -hullámot az ajánlásban szereplő ellipszis helyett szinusz hullámból képezték, elkerülve az EKG-re nem jellemző és felüláteresztő szűrés hatására csúcsokat adó hirtelen változásokat a T -hullám határainál. Az RR-intervallum 803 ms volt, hogy megelőzhető legyen az EKG és a hálózati interferencia (20 ms periódus) szinkronizációja. A tiszta felvételek mellett hálózati brummal (50 Hz szinusz hullám 25% és 50% peak-to-peak amplitúdó a kamrai komplex amplitúdójához viszonyítva) és elektromiográfiás műtermékkel (Gauss-eloszlású véletlen sorozat, 10%, 25% és 50% rms amplitúdó a kamrai komplex amplitúdójához viszonyítva) szennyezett felvételeket elemeztek.

A szűrést másodrendű Butterworth karakterisztikájú, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 és 10 Hz határfrekvenciájú felüláteresztő, továbbá negyedrendű Bessel és Butterworth karakterisztikájú, 20, 40, 60, 80 és 100 Hz aluláteresztő szűrőkkel végezték (technikai részletek a 3. 3. pontban). A Bessel filter kiváló impulzus

válasszal bír az átviteli tartományban mutatott lapos csoportfutási idő következtében, míg a Butterworth filter a legegyszerűsebb erősítést mutatja az átviteli tartományban, ugyanakkor a lehető legmeredekebben vág a zárási tartományban. Az adott hét referencia pont abszolút fáziskésésének és a csúcs amplitúdó SD és legnagyobb értékeit, továbbá a mért RR-intervallumok \pm csökkenésének átlagát SD és a névleges 803 ms-tól való maximális eltérését számolta ki a \pm átlagát program.

A hálózati interferencia és elnyomásának hatása

Az előre definiált EKG mintákat (Rs-amplitúdó=4 V, T-amplitúdó=1.2 V, RT=350 ms, Rs=65, 85 vagy 115 ms) 803 ms időközönként ismételték tíz alkalommal. A hálózati interferenciát 5%, 10%, 25% és 50% peak-to-peak amplitúdójú (a kamrai komplex amplitúdójához viszonyítva) 50 Hz frekvenciájú szinusz hullám reprezentálta (3. 2.). A kamrai komplex hét referencia pontját detektálták, manuálisan ellenőrizték. Az átlagot, SD-t és a tiszta EKG megfelelő pontjához viszonyított maximális eltérést számították ki felvételenként (3. 2.) a lyukszűrés előtt és után. Az 50 Hz frekvenciájú sávzárást Q=2, 5, és 10 jósági tényezők mellett hangolták be (3. 3.).

A mintavételi frekvencia hatása a time domain paraméterekre

Két, 375 szívciklust tartalmazó, kiváló minőségű EKG felvételt nyertek egy egészséges fiatalból és egy magas kardiovaszkuláris kockázatú cukorbetegből, akinek erősen beszűkült a szívritmus variabilitása. 800 ms átlagos RR-intervallumot és 5-120 ms SD-t állítottak be 5 ms lépésekben a 3. 4. szoftveren. A beállított tachogramokat mintavételezték 1-10 ms mintavételi intervallumokkal 1 ms lépésekben, mindegyiket tíz alkalommal ismételve. Az átlagos RR-intervallum, SDNN, RMSSD és a pNN50 értékek átlagát, SD-t, RAE-t és RPE-t határozták meg, melyek közül a két utóbbit részletezzük.

Eredmények

Az alul- és felüláteresztő szűrők hatásának vizsgálata

A zajmentes EKG jel felüláteresztő szűrése egyenáramtól egészen 0.5 Hz frekvenciáig nem okoz jelentős morfológiai eltérést. Viszont 1 Hz és 2 Hz határfrekvenciánál szignifikáns változások jelennek meg, 5 Hz és 10 Hz szűrés esetében pedig felismerhetetlen az EKG görbe, de még ebben az esetben is 1 ms pontossággal detektál az algoritmus.

A tiszta EKG jel aluláteresztő szűrése minimális amplitúdó csökkenést okoz. A fázistolás függ a határfrekvenciától (20 Hz: 12-19 ms, 100 Hz: 4-5 ms), a kiválasztott referencia ponttól (felszálló szár: 4-14 ms, csúcs: 5-15 ms, leszálló szár: 4-20 ms), a szűrő típusától (a csúcson, 20 Hz-nél, Bessel: 17 ms, Butterworth: 14-15 ms), és kisebb mértékben a kamrai komplex szélességétől (65 ms: 4-19 ms, 115 ms: 4-20 ms). Az RR-intervallum detektálás viszont 1 ms hibahatáron belül marad mindkét szűrő típus alkalmazásakor az egy sorozaton belüli konstans fáziskésésnek köszönhetően.

A hálózati interferencia jelenléte az amplitúdójával arányosan torzítja az RR-intervallum mérését. 25% és 50% interferencia esetén a csúcs a legérzékenyebb referencia pont (maximális eltérés a nominális 803 ms-tól rendre 13 ms és 16 ms), a szárok valamivel stabilabbak (maximum differencia rendre 10 ms és 14 ms). Bessel vagy Butterworth karakterisztikájú szűréssel 40 Hz határfrekvencián nem javítható szignifikánsan az RR-intervallum detektálás megbízhatósága. Bessel-szűréssel 20 Hz határfrekvenciánál az 50% interferencia által okozott maximális hibát a csúcson 7 ms-ra, a szárokon 2 ms-ra lehet csökkenteni. Butterworth karakterisztika mellett ugyanilyen határfrekvenciánál a csúcs esetén 12 ms-ra, a lejtőkön 7 ms-ra csökken a maximális eltérés. A 25% interferenciával szennyezett csoportban a Bessel szűrés 20 Hz frekvencián maximálisan 3 ms eltérést eredményez a csúcson, míg 1 ms eltérést a szárokon. 20 Hz-es Butterworth szűrőt alkalmazva a hiba 8 ms-ra, illetve 3 ms-ra csökken.

A Gaussi zaj hozzáadása a kiválasztott referencia ponttól függetlenül megjósolhatatlan detektálási hibát okoz. A 10% amplitúdójú zaj 3-10 ms maximális RR-intervallum eltérést eredményez a 803 ms-hoz képest. Az aluláteresztő szűréssel 0-1 ms-ra csökken a hiba, mindkét szűrőtípus és minden vizsgált határfrekvencia esetében. A 25% rms amplitúdójú zaj 6-26 ms hibával jár, ami 1-2 ms-ra csökken 20-40 Hz (3. ábra B), illetve 1-3 ms-ra redukálódik 60-100 Hz határfrekvencián. Az 50% amplitúdójú zajszennyezés 10-34 ms eltérést okoz, melyet a 20-40 Hz szűrés 1-4 ms-ra, a 60-100 Hz szűrés 2-6 ms-ra mérsékel.

A Bessel filter jobbnak bizonyult a hálózati interferencia által okozott hiba csökkentésében (valószínűleg kedvezőbb impulzus válasza miatt), viszont a Gaussi zaj vizsgálatakor nem volt jelentős különbség a Bessel és Butterworth szűrők között az RR-intervallum detektálás pontosságának vonatkozásában.

A hálózati interferencia és elnyomásának hatása

A tiszta EKG felvételek sávzáró szűrése nem okoz 1 ms-nál nagyobb RR-intervallum detektálási hibát, ami az 1 kHz-es mintavételi frekvenciával összemérhető. A hálózati brumm a nagyságával arányosan torzítja az EKG morfológiáját és a referencia pontok lokalizálását: 5% interferenciánál: 2 ms, 10% interferenciánál: 4 ms, 25%-nál: 8 ms, és 50% esetén: 14 ms, melyet korrigál a lyukszűrés bármelyik vizsgált jósági 1 ms a csúcs és a felszálló szár esetén, lásd 4. ábra). A \leq tényező mellett (kamrai komplex csúcsának detektálása szűrés nélkül 10% interferenciáig 1 ms hibával történik. A szélesebb kamrai komplex valamivel érzékenyebb a hálózati interferenciára, de ez a különbség elhanyagolható.

A mintavételi frekvencia hatása a time domain paraméterekre

Az átlagos RR-intervallum RAE és RPE paramétere 0.1% alatt volt az egész vizsgálat során mind az egészséges, mind pedig a magas rizikójú csoportban. Az SDNN-RAE az egészséges és a magas rizikójú csoportban azonos trendet mutatott, mivel ezt a paramétert állítottuk be a megadott tartományban. A kisebb névleges SD magasabb SDNN-RAE-t és RPE-t eredményezett. A RAE az 1%-os limitet 2 ms mintavételi intervallumnál, az 5%-ot 4 ms-nál, a 30%-ot 10 ms mintavételnél lépte túl a névleges SD=5ms sorozat

esetén. 35 ms nominális SD felett a RAE 1% alatt maradt még 10 ms mintavételnél is. A RPE 1% fölé 7 ms-os mintavételnél emelkedett, és a 2%-ot nem érte el az egész mérés során.

Az RMSSD-RAE a legalacsonyabb névleges variabilitású mintákban a 225.2%-ot is elérte 10 ms mintavételi intervallummal. Az 5 ms névleges szórású, magas rizikójú betegről származtatott tachogram mintavételezése 1, 2, 4 ms intervallumonként rendre 4.8%, 18.1% és 54.3% RAE-t okozott. A 15 ms nominális szórású, magas rizikójú sorozat mintavételezése 1, 2, 4, 10 ms időközökkel rendre 0.7%, 2.5%, 7.8% és 45.1% RAE-vel járt. A RPE 5% alatt maradt az egész analízis során. Az azonos névleges SD ellenére eltérő RMSSD trend az egészséges és a magas rizikójú sorozatok között kiválóan tükrözi az ütésről ütésre (beat-to-beat) történő variabilitás globális variabilitáshoz viszonyított még erősebb beszűkülését.

A pNN50-RAE még 1 ms mintavétel esetén is 16% volt az egészséges, közel 50% a magas rizikójú csoportban. A 200% fölötti RPE gyenge reprodukálhatóságra utal. A pNN50 rossz statisztikai sajátságokkal bír, mivel az 50 ms-os küszöbérték diszkrét természetet kölcsönöz, ezért kifejezetten érzékeny zajokra.

Következtetések

Az EKG erősítő 0.5-20 Hz frekvencia-átvitelére elegendő kizárólagos HRV elemzéshez, mely megőrzi az EKG felismerhetőségét, ugyanakkor javítja az RR-intervallum detektálás pontosságát és megbízhatóságát a hálózati brumm és az elektromiográfiás zaj csökkentésével.

A mindenütt jelenlévő hálózati interferencia szűrése sávzáró filterrel javasolható HRV elemzés során, mivel a notch filter önmagában nem rontja az RR-intervallum detektálás pontosságát, csak javíthatja, amennyiben jelentős AC interferencia van jelen.

Az átlagos RR-intervallum kifejezetten ellenálló a mintavételi hibával szemben. Az SDNN és az RMSSD erősen beszűkült variabilitású betegben is megbízható méréséhez 1 ms mintavétel ajánlott. Magasabb mintavétel is megfelelő lehet, amennyiben nagyobb a várható variabilitás vagy annak változása. A pNN50 nem megbízható, használata nem javasolt.

Az elvégzett vizsgálatok előreláthatóan felhívják a figyelmet a HRV mérés néhány elhanyagolt technikai csapdájára és az igényt azok elkerülésére, mely hozzájárulhat ezen dinamikus fejlődő területen fennálló ellentmondások tisztázásához.

Új eredmények

A határfrekvenciák, a hálózati interferencia sávzáró szűrése és a mintavételi frekvencia tekintetében a hozzáférhető szakirodalomban nem található más, hasonló részletességgel végzett empirikus vizsgálat a szívritmus variabilitás mérés megbízhatóságával kapcsolatban az RR-intervallum detektálás tekintetében. Vizsgálataink egyértelműen demonstrálják a nem megfelelő technikai feltételek által okozott mérési hibákat. A legátfogóbb ajánlásban megállapított mintavételi frekvencia és analóg felső határfrekvencia javasolt értékei egyértelműen megcáfolhatók eredményeink alapján. Az ott javasolt 200 Hz felső határfrekvencia

több magas frekvenciájú zajt őriz meg, ami inkább jelentős RR-intervallum detektálási hibát, és következésképp HRV mérési hibát eredményezhet.

Az altémához kapcsolódó publikációk:

1. Hejmel L. Suppression of power-line interference by analog notch filtering in the ECG signal for heart rate variability analysis. To do or not to do? Med Sci Monit. 2004;10(1):MT6-MT13.
2. Hejmel L. Reappraising technical aspects of the ECG recording for HRV analysis. ESH-BAVAR Congress Book. 2004:37. (Absztrakt)
3. Hejmel L, Róth E. What is the adequate sampling interval of the ECG signal for heart rate variability analysis in the time domain? Physiol Meas. 2004;25:1405-1411. (IF: 1.159)
4. Hejmel L, Kellényi L: The corner frequencies of the ECG amplifier for heart rate variability analysis. Physiol Meas 2005, 26: 39-47 (IF: 1.159)
5. Atlasz T, Kellényi L, Kovacs P, Babai N, Thuroczy G, Hejmel L, Hernadi I: The application of surface plethysmography for heart rate variability analysis after GSM radiofrequency exposure. J Biochem Biophys Methods. 2006;69(1-2):233-236. (IF: 1.611)
6. Kovács I, Hejmel L, Gál I, Róth E. Sequential changes of heart rate variability following laparoscopic or open cholecystectomy. Exp Clin Card. 2006, 11(3): 256. (Absztrakt)